



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|---|--|---|
| (51) Classification internationale des brevets⁵ : A61K 9/51 | | (11) Numéro de publication internationale: WO 93/25195 |
| | | (43) Date de publication internationale: 23 décembre 1993 (23.12.93) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00594 | | (74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR). |
| (22) Date de dépôt international: 16 juin 1993 (16.06.93) | | (81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). |
| (30) Données relatives à la priorité: 92/07287 16 juin 1992 (16.06.92) FR | | Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> |
| (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75007 Paris (FR). | | |
| (72) Inventeurs ; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : SKIBA, Mohamed [MA/FR]; 12, chemin des Hauts-Graviers, F-91370 Verrières-le-Buisson (FR). WOUESSIDJWE, Denis [CM/FR]; 90 B, avenue François-Molé, F-92160 Antony (FR). COLEMAN, Antony [GB/FR]; 13, rue Machelard, F-91640 Brûis-sous-Forges (FR). FESSI, Hatem [TN/FR]; 3, rue Friant, F-75014 Paris (FR). DEVISSAGUET, Jean-Philippe [FR/FR]; 14, boulevard d'Inkermann, F-92200 Neuilly-sur-Seine (FR). DUCHENE, Dominique [FR/FR]; 8 bis, rue Laurent-Pichat, F-75116 Paris (FR). PUISIEUX, Francis [FR/FR]; 66, rue de Strasbourg, F-94700 Maisons-Alfort (FR). | | |
| (54) Titre: PREPARATION AND USE OF NOVEL CYCLODEXTRIN-BASED DISPERSIBLE COLLOIDAL SYSTEMS IN THE FORM OF NANOSPHERES | | |
| (54) Titre: PREPARATION ET UTILISATION DE NOUVEAUX SYSTEMES COLLOIDAUX DISPERSIBLES A BASE DE CYCLODEXTRINE, SOUS FORME DE NANOSPHERES | | |
| (57) Abstract | | |
| <p>A nanoparticulate system prepared by: 1) preparing a liquid phase essentially consisting of a solution of cyclodextrin modified by acyl groups in an organic solvent or solvent mixture, an active molecule being optionally added thereto; 2) preparing a second liquid phase essentially consisting of water or an aqueous mixture optionally containing one or more surfactants, and optionally having an active molecule added thereto; and 3) gently stirring one of the liquid phases resulting from 1) or 2) into the other in order to obtain, almost instantaneously, a colloidal solution of modified cyclodextrin nanospheres. If required, all or part of the solvent and all or part of the water may be removed. Said system may be used as a carrier for pharmaceuticals, cosmetics, chemicals, etc.</p> | | |
| (57) Abrégé | | |
| <p>La préparation du système nanoparticulaire est caractérisée selon l'invention en ce que: 1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de cyclodextrine modifiée par des groupes acyle dans un solvant ou un mélange de solvants organique(s), et pouvant être additionnée d'une molécule active; 2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou un mélange aqueux, pouvant contenir un ou plusieurs surfactifs, et pouvant être additionnée d'une molécule active; 3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous 1) ou 2) à l'autre de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanosphères de cyclodextrine modifiée. Le cas échéant on élimine tout ou partie du solvant et de l'eau. Applications: vecteurs de produits chimiques, pharmaceutiques, cosmétiques, etc.</p> | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|-----------------------|
| AT | Autriche | FR | France | MR | Mauritanie |
| AU | Australie | CA | Géorgie | MW | Malawi |
| BB | Banladesh | GB | Royaume-Uni | NL | Pays-Bas |
| BE | Belgique | CN | Guinée | NO | Norvège |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | PL | Pologne |
| BI | Bénin | IE | Irlande | PT | Portugal |
| BR | Brésil | IT | Italie | RO | Roumanie |
| CA | Canada | JP | Japon | RU | Fédération de Russie |
| CF | République Centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CG | Congo | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CH | Suisse | KZ | Kazakhstan | SK | République slovaque |
| CI | Côte d'Ivoire | LJ | Liechtenstein | SN | Sénégal |
| CM | Cameroun | LK | Sri Lanka | SU | Union soviétique |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CZ | République tchèque | MC | Monaco | TC | Togo |
| DE | Allemagne | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| DK | Danemark | ML | Mali | US | Etats-Unis d'Amérique |
| ES | Espagne | MM | Mongolie | VN | Viet Nam |
| FI | Finlande | | | | |

- 1 -

"Préparation et utilisation de nouveaux systèmes colloïdaux dispersibles à base de cyclodextrine, sous forme de nanosphères"

La présente invention a pour objet la préparation et l'application d'un nouveau système colloïdal dispersible à base de cyclodextrine sous forme de particules sphériques de type matriciel et de taille 5 allant de 90 à 900 nm (nanosphères), pouvant contenir une molécule active.

Des particules submicroniques sont déjà connues notamment d'après BE-A-808 034, BE-A-839 748, BE-A-869 107, FR-A-2 504 408, EP-A-02 75 796 et EP-A-03 49 10 428.

Ainsi, les brevets belges n°808 034 et 839 748 décrivent des particules submicroniques formées de matières polymérisables comme les dérivés de l'acide acrylique ou méthacrylique par exemple le méthacrylate 15 de méthyle ou de butyle, le méthacrylamide ou un mélange de ces composés. Les particules submicroniques formées par polymérisation micellaire de ces différents monomères ont à la fois la propriété d'enrober totalement ou partiellement la substance biologiquement active et la 20 propriété de former des suspensions aqueuses colloïdales qui permettent une administration parentérale de ces particules ainsi chargées de molécules biologiquement actives.

Cependant, les polymères de dérivés de 25 l'acide acrylique ou méthacrylique décrits dans ces brevets pour la préparation de particules submicroniques, contenant une molécule biologiquement active, sont substantiellement stables de sorte qu'ils subsistent longtemps tels quels dans les tissus ou dans la cavité 30 où ils ont été administrés et ceci constitue un inconvénient, plus particulièrement dans le cas d'administration parentérale en médecine humaine.

Le brevet belge n°869 107 remédie à ce

désavantage en décrivant des nanoparticules biodégradables contenant une molécule biologiquement active. Le matériau utilisé est constitué par des polymères de cyanoacrylate d'alkyles déjà utilisés en chirurgie comme adhésifs tissulaires et connus pour leur biodégradabilité.

Son inconvénient majeur tient à la structure des particules obtenues, à la toxicité des produits de dégradation et au mode d'incorporation de la substance active. Le mode opératoire décrit permet seulement de préparer des particules formées d'un réseau polymérique très dense. La molécule active ne peut être incorporée que par adsorption et le taux fixé est toujours relativement faible. De plus il est difficile de maîtriser le poids moléculaire du polymère constitutif des nanoparticules et il est nécessaire, notamment en vue d'usages biologiques, d'éliminer des monomères et oligomères résiduels, le cas échéant les réactifs de polymérisation (initiateur et catalyseur) en excès ainsi que les surfactifs s'ils sont utilisés à forte concentration ou s'ils ne sont pas biocompatibles. Or, la purification (ultracentrifugation, dialyse) s'avère souvent lourde car la filtration des nanoparticules, vu leur taille, n'est pas toujours possible.

On a aussi proposé des nanoparticules à base de protéines, notamment par dénaturation à chaud d'une émulsion eau dans l'huile d'une solution protéique telle que l'albumine, (Kramer, P.A : J.Phar.Sci., 63 1646, 1974) ou par désolvatation d'une solution protéique, telle que la gélatine, par un sel minéral ou l'éthanol (Marty et coll., Austr. J.Pharm. Sci., 6, 65, 1978, ou Pharm. Acta Helv. 1, 53, 1978), puis, dans les deux cas, par durcissement au moyen d'un aldéhyde. Les nanoparticules selon Kramer ont pour inconvénient principal de nécessiter une émulsification préalable de la solution

aqueuse de la matière première macromoléculaire dans une phase continue huileuse. Cette émulsion devant être très fine, l'utilisation de surfactifs et d'appareillages ad-hoc (sonicateur, etc) est indispensable pour obtenir des 5 nanoparticules de taille convenable. Quant aux nanoparticules selon Marty, elles font appel à des quantités importantes de sels minéraux qu'il faut éliminer, de même que l'excès d'aldéhyde et de sulfite ou de métabisulfite utilisés pour neutraliser ce dernier.

10 EP-A-02 75 796 et -03 49 428 décrivent des procédés d'obtention de nanoparticules d'une substance par une méthode de désolvatation consistant à mélanger deux phases de solvants, l'un étant non-solvant de la substance mais soluble dans l'autre solvant.

15 Les nanoparticules selon EP-A-03 49 428 sont préparées à certaines conditions c'est-à-dire, la température du solvant doit être inférieure à la température de coagulation de la protéine et le pH du non-solvant doit être éloigné du point isoélectrique de la 20 protéine.

Selon la présente invention on propose comme 25 matière de base des nanosphères, des cyclodextrines modifiées préparées par acylation de cyclodextrines naturelles. Elles ont l'avantage d'être biodégradables, leur administration est suivie d'une libération de la molécule active, et il est possible d'obtenir une biodégradabilité, convenablement programmée en faisant 30 appel à des cyclodextrines modifiées différant entre elles par la nature de la chaîne alkyle du groupe acyle utilisé. De telles cyclodextrines modifiées et leur préparation sont notamment décrites par Ping Zhang, Chang-Chung Ling, A.W. Coleman, Parrot-Lopez et H.Galons dans Tetr. Lett. 32, N°24, 2769-70, 1991.

préparation d'un nouveau système colloïdal dispersible à base de cyclodextrine sous forme de nanosphères caractérisée en ce que :

- 1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de cyclodextrine modifiée par des groupes acyle dans un solvant ou mélange de solvants organique(s) contenant ou non un surfactif et pouvant être additionnée d'une molécule active,
- 5 2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou un mélange aqueux, contenant ou non un surfactif et pouvant être additionnée d'une molécule active, et
- 10 3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre, de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanosphères de cyclodextrine modifiée contenant le cas échéant ladite molécule active.

Si l'on désire, on peut éliminer tout ou une partie du solvant ou du mélange de solvants et de l'eau ou du mélange aqueux, de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en nanosphères ou une poudre de nanosphères.

La cyclodextrine modifiée utilisée selon l'invention est notamment une cyclodextrine dont les groupes hydroxy, de préférence les hydroxy secondaires de chaque unité glucose la formant ont été estérifiés par un groupe acyle aliphatique ou aromatique pouvant être substitués par un ou plusieurs groupements fonctionnels, telle qu'une béta-cyclodextrine acylée par un groupe alcanoyle de 2 à 20 atomes de carbone, notamment 6 à 14 atomes de carbone. Ces produits sont décrits par Ping Zhang et coll. précité.

La molécule active est ajoutée de préférence à la phase dans laquelle elle est soluble, notamment à 35 la phase (1) si elle est liposoluble ou à la phase (2)

si elle est hydrosoluble.

La molécule active peut être un principe médicamenteux, un réactif biologique, un principe cosmétique, ou un produit chimique. L'invention permet d'obtenir des nanosphères de cyclodextrine modifiées seules (utilisables telles quelles) ou comprenant cette molécule active (emprisonnée dans sa structure).

Le solvant organique dans la phase (1) peut être un alcool tel que méthanol, éthanol, isopropanol, etc... ou une cétone telle que l'acétone.

L'eau ou un mélange aqueux (eau salée, acidifiée, alcalinisée, etc...) est le non-solvant dans la phase (2).

Le procédé peut être réalisé à différentes températures (qui influent peu sur son déroulement), notamment entre 0°C et la température d'ébullition des solvants. Le rapport des volumes phase (1)/phase (2) peut varier préférentiellement de 0,1 à 1.

Le(s) surfactif(s) est (sont) présent(s) notamment en une proportion de 0,1 à 10%, de préférence 0,2 à 2% en poids de la suspension colloïdale obtenue dans l'étape 3.

On entend par agitation modérée une agitation suffisante pour homogénéiser le mélange des phases (1) et (2), par exemple au moyen d'un barreau magnétique à 50-500 tr/min, par exemple 100 tr/min. Elle n'est pas indispensable pour de faibles quantités de produit.

Finalement, la suspension colloïdale de nanosphères peut être à volonté concentrée, stérilisée, tamponnée (par exemple au pH physiologique), et lyophilisée. Pour les sphères obtenues selon la présente invention, la préparation a l'avantage d'être réversible: on peut solubiliser les nanosphères et repréparer les nanosphères à partir de cette solution suivant le mode opératoire. De plus les suspensions de nanosphères présentent une grande stabilité avec le temps.

Les nanosphères obtenues suivant l'invention

se présentent au microscope électronique à transmission, après coloration négative avec l'acide phosphotungstique, sous la forme de particules non contrastées sensiblement sphériques et, après cryofracture sous la forme de particules sphériques denses de type matriciel.

Selon les conditions opératoires, il est possible d'obtenir des nanosphères dont le diamètre varie d'environ 90 à environ 900 nanomètres, de préférence de 90 à 300 nm, notamment 150 à 300 nm.

Les nanosphères obtenues de l'invention peuvent contenir au sein de leur réseau une molécule active par exemple une molécule médicamenteuse à usage humain ou vétérinaire ou un produit pour le diagnostic. Comme molécule médicamenteuse, on peut citer plus particulièrement les produits chimiques doués de propriétés pharmacologiques et par exemple, les substances antimitotiques ou antinéoplasiques comme la méthotréxate, l'actinomycine D, l'adriamycine, la daunorubicine, la bléomycine, et la vincristine ou les substances antibiotiques comme les pénicillines, les céphalosporines et l'acide nalidixique, les antibiotiques du type aminoglycoside et ceux de la famille de la virginiamycine et les substances hormonales, notamment les hormones stéroïdiennes. Ces molécules médicamenteuses peuvent être notamment des composés chimiques à haut poids moléculaire comme l'insuline et l'héparine et l'expression "molécule médicamenteuse" comprend également des produits biologiques comme les antigènes, les enzymes, les protéines, les virus ou des constituants de virus, de bactéries ou de cellules. Les nanosphères suivant l'invention peuvent également contenir un produit pour le diagnostic comme par exemple la fluorescéine et la séralbumine humaine radio-active.

En médecine humaine ou vétérinaire, les nanosphères de l'invention peuvent être utilisés comme

vecteurs de médicaments administrés avec ou sans excipient adéquat par voie orale, sous cutanée, intradermique, intramusculaire ou intraveineuse et leur diffusion dans les tissus les rend particulièrement intéressantes pour les traitements par voie générale.

Les nanosphères de la présente invention, contrairement aux nanoparticules formées d'un réseau dense, présentent l'avantage de permettre un taux d'incorporation nettement plus élevé. Ceci est dû à la possibilité de double charge, en premier lieu, une charge dans le réseau et en second lieu dans la cavité de la cyclodextrine à condition que la molécule invitée ait une conformation convenable par rapport à la cavité.

L'invention est illustrée par les exemples suivants :

Exemple 1

Préparation de nanosphères de cyclodextrine modifiée à 6 carbone.

On utilise une bêta-cyclodextrine dont les OH secondaires des unités glucose la formant ont été extérifiés par des groupes hexanoyle, préparée selon Ping Zhang et coll.

Phase 1

| | | |
|----|-----------------------------------|-------|
| 25 | béta-cyclodextrine modifiée à 6 C | 50 mg |
| | acétone | 50 ml |

Phase 2

| | |
|--------------------------------|---------|
| Pluronic (R) F68 | 62,5 mg |
| eau déminéralisée ou distillée | 25 ml |

La phase 1 est ajoutée sous agitation magnétique à la phase 2. Le milieu devient immédiatement opalescent par formation de nanosphères de cyclodextrine modifiée. La taille moyenne des nanosphères mesurée par un diffractomètre à rayon laser (Nanosizer (R) de chez Coultronics) est de 180 nm avec un indice moyen de

dispersion de 0,08.

La suspension peut être concentrée sous pression réduite au volume désiré, par exemple 5 ml ou plus ou moins.

5 Après un repos prolongé (14 mois), l'aspect de la suspension de nanosphères demeure inchangé et on n'observe, en particulier, ni sédimentation irréversible, ni variation de la taille des nanosphères.

10 **Exemple 2 : (variante de l'exemple 1)**

On procède comme dans l'exemple 1, mais en ajoutant la phase aqueuse à la phase acétonique. Les nanosphères obtenus présentent les mêmes caractéristiques que dans l'exemple 1.

15 **Exemple 3 : (variante de l'exemple 1)**

On procède comme dans l'exemple 1, mais en ajoutant la phase acétonique à la phase aqueuse sans agitation du milieu. Les nanosphères obtenues ont une taille de 200 nm avec un indice moyen de dispersion 0,5.

20 **Exemple 4 : (variante de l'exemple 1)**

On procède comme dans l'exemple 1, mais sans ajouter d'agent de surface à la phase aqueuse. Les nanosphères obtenues ont une taille de 200 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,6.

25 **Exemple 5**

Préparation stérile de nanosphères de cyclodextrine modifiée à 6 carbone. On procède comme dans l'exemple 1, puis la suspension est stérilisée à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes. La taille moyenne des particules demeure pratiquement inchangée après stérilisation.

Exemple 6

Préparation lyophilisée de nanosphères de cyclodextrine modifiée à 6 carbone.

On procède comme dans l'exemple 1, puis la suspension est lyophilisée. L'addition d'un cryoprotecteur (maltose, tréhalose...etc) n'est pas indispensable. La taille moyenne des particules mesurée juste après la lyophilisation demeure inchangée.

10

Exemple 7

Préparation de nanosphères de cyclodextrine modifiée à 12 carbone.

On procède comme dans l'exemple 1, en remplaçant la cyclodextrine modifiée à 6 carbone par la cyclodextrine modifiée à 12 carbone c'est-à-dire une beta-cyclodextrine acylée par des groupes dodecanoyle. La taille moyenne des nanosphères est de 172 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,1. Ces nanosphères peuvent être stérilisées à l'autoclave et lyophilisées comme celles avec 6 carbone.

25

Exemple 8

Préparation de nanosphères de cyclodextrine modifiée à 14 carbone.

On procède comme dans l'exemple 1, en remplaçant la cyclodextrine modifiée à 6 carbone par la cyclodextrine modifiée à 14 carbone, c'est-à-dire acylée par des groupes tétradécanoyle. La taille moyenne des nanosphères est de 110 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,1. Les nanosphères de cyclodextrine modifiée à 14 carbone peuvent être stérilisées à l'autoclave et lyophilisés comme celles avec 6 carbone.

35

Exemple 9

Stabilité des nanosphères de cyclodextrine en présence de forces ioniques variables.

On procède comme indiqué dans l'exemple 1.

- 5 Après concentration de la suspension de nanosphères de cyclodextrine modifiée jusqu'à un volume de 10 ml, on ajoute progressivement à celle-ci des quantités croissantes de chlorure de sodium. La suspension de nanosphères est parfaitement stable lorsque la concentration en chlorure de sodium correspond à l'isotonie avec le sang et le demeure jusqu'à une concentration supérieure à 3 fois la concentration isotonique.
- 10

Exemple 10

15 Stabilité des nanosphères de cyclodextrine en présence d'un milieu acide ou basique.

On procède comme indiqué dans l'exemple 1.

- Après concentration de la suspension de nanosphères de cyclodextrine jusqu'à un volume de 10 ml, on ajoute progressivement à celle-ci des quantités croissantes d'acide chlorydrique (1N) ou de la soude (1N). La suspension de nanosphères est parfaitement stable.
- 20

Exemple 11

- 25 Stabilité des nanosphères de cycodextrine à la température.

On procède comme indiqué dans l'exemple 1.

- 30 Après concentration de la suspension de nanosphères de cyclodextrine jusqu'à un volume de 10 ml, on place chaque lot à 4°C, 25°C et 40°C.

Les suspensions demeurent stables dans le temps et ne présentent, après 14 mois de conservation, ni sémentation irréversible, ni variation de la taille des nanosphères.

Exemple 12

Préparation de nanosphères en présence d'un sel.

On procède comme indiqué dans l'exemple 1, mais la phase aqueuse est additionnée de 90 mg de chlorure de sodium.

Après concentration de la suspension de nanoparticules jusqu'à un volume de 10 ml, correspondant compte tenu du chlorure de sodium à l'isotonie avec le sang, les nanosphères ont une taille moyenne de 200 nm avec un indice moyen de dispersion de 1.

La suspension demeure stable dans le temps et ne présente, après 14 mois de conservation, ni sédimentation irréversible, ni variation de la taille des nanoparticules.

15

Exemple 13

Addition de non-solvant dans la phase du solvant.

On procède comme dans l'exemple 1, mais la cyclodextrine est dissoute dans un mélange acétone/eau (90/10, v/v), au lieu d'acétone pure. La présence d'une faible proportion de non-solvant de la cyclodextrine dans un solvant, conduit à des nanosphères dont la taille moyenne est de 180 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,5.

25

Exemple 14

Stabilité des nanosphères de cyclodextrine aux ultrasons.

On procède comme dans l'exemple 1. Après concentration de la suspension de nanosphères de cyclodextrine jusqu'à un volume de 10 ml, on place la suspension de nanosphères de cyclodextrine dans un bain à ultrasons pendant trois heures.

La suspension demeure stable dans le temps et ne présente, après 14 mois de conservation, ni sédimentation

35

irréversible, ni variation de la taille des nanosphères.

Exemple 15

- Préparation de nanosphères en présence d'un principe actif lipophile.
- On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 20 mg d'indométabine dans la phase acétonique. Les nanosphères obtenues ont une taille moyenne de 200 nm avec un indice de dispersion de 0,5. Après ultracentrifugation et dosage de l'indométabine dans la phase dispersante, la quantité de principe actif incorporé dans les nanosphères représente 70% de la quantité initiale.

Exemple 16

- Préparation de nanosphères contenant de la doxorubicine.
- On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 5 mg de doxorubicine dans la phase aqueuse. Les nanosphères obtenues ont une taille moyenne de 200 nm et un indice moyen de dispersion de 1. Après ultracentrifugation et dosage de la doxorubicine dans la phase dispersante, la quantité de principe actif incorporé dans les nanosphères représente 60% de la quantité initiale.

- Exemple 17
- Préparation de nanosphères contenant de la progestérone.
- On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 150 mg de progestérone dans la phase 1. Les nanosphères obtenues ont une taille moyenne de 120 nm et un indice de dispersion de 0,2. Après ultracentrifugation et dosage de la progestérone dans la phase dispersante, la quantité de principe actif incorporé dans les nanosphères représente 60% de la quantité initiale.

Exemple 18

Préparation de nanosphères contenant de l'amphotéricine B.

On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 6 mg 5 d'amphotéricine B dans la phase 1. Les nanosphères obtenues ont une taille moyenne de 180 nm et un indice de dispersion de 0,2. Après ultracentrifugation et dosage de l'amphotéricine dans la phase dispersante, la quantité de principe actif incorporé dans les nanosphères représente 10 90% de la quantité initiale.

Exemple 19

Préparation de nanosphères contenant un colorant lipophile, le soudan III.

On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 5 mg 15 de soudan III dans la phase 1. Une faible quantité est précipitée et reste sur le filtre. Les nanosphères obtenues ont une taille moyenne de 130 nm et un indice de dispersion de 0,2.

Les nanosphères obtenues selon l'invention 20 peuvent trouver des applications dans de nombreux secteurs techniques.

En tant que "vecteurs" de principe actif, en 25 thérapeutique humaine et animale les nanosphères permettent d'envisager :

d'atteindre de nouveau sites d'action, en particulier intracellulaires, voire intralysosomiaux ;
d'utiliser de nouvelles voies d'administration pour les principes actifs connus, en augmentant la 30 stabilité et/ou l'absorption des principes actifs, ou en permettant la réalisation de formes injectables par voie intravasculaire, de principes actifs insolubles ;

de modifier la distribution tissulaire des principes actifs, par un meilleur ciblage vers des sites 35 d'actions favorables et/ou un détournement des sites

d'effets indésirables voire toxiques (amélioration de l'index thérapeutique).

En pharmacie, ces dispersions colloïdales de cyclodextrine peuvent permettre notamment :

- 5 de réaliser des formes injectables de médicaments insolubles,
 de stabiliser un principe actif médicamenteux.

10 Dans le domaine de la phytopharmacie les nanosphères peuvent véhiculer des insecticides, des pesticides, etc. Leur taille peut permettre d'envisager une action plus puissante par une meilleure pénétration à travers la cuticule. La faible viscosité de la dispersion autorise une pulvérisation très facile sous forme de gouttelettes de très petite taille plus efficaces car plus couvrantes.

15 En cosmétologie, les nanosphères de cyclodextrine peuvent transporter des produits anti-radicalaires ou autres au niveau du derme.

20 Dans le domaine des peintures, vernis et traitements des surfaces d'une manière générale, les nanosphères permettent de véhiculer des pigments, des réactifs, des décapants sous forme de dispersion aqueuse de très faible viscosité, aisée à pulvériser ou à appliquer, et qui peut, si nécessaire, être rendue visqueuse, voire adhésive (remise en suspension des nanosphères dans un véhicule approprié). La taille réduite des nanosphères conduit à une très grande finesse du dépôt et à une très grande homogénéité, par exemple de pigmentation.

25 Les nanosphères obtenues selon l'invention peuvent être utilisées dans les domaines de l'imprimerie et de la reprographie, du traitement de surface des textiles et des fibres, ou autre, de la photographie, de la lubrification, de l'agriculture.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un nouveau système colloidal dispersible à base de cyclodextrine sous forme de nanosphères, caractérisé en ce que

5 1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de cyclodextrine modifiée par des groupes acyle dans un solvant ou mélange de solvants organique(s) contenant ou non un surfactif et pouvant être additionnée d'une molécule active,

10 2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou un mélange aqueux, contenant ou non un surfactif et pouvant être additionnée d'une molécule active, et

15 3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre, de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanosphères de cyclodextrine modifiée contenant le cas échéant ladite molécule active.

20 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on élimine tout ou partie du solvant ou du mélange de solvants et de l'eau ou du mélange aqueux de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en nanosphères ou à obtenir un poudre de nanosphères.

25 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit solvant de la phase (1) est choisi parmi les alcools et les cétones ou leurs mélanges.

30 4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la β -cyclodextrine modifiée est une β -cyclodextrine acylée par un groupe acyle aliphatique ou aromatique.

35 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la cyclodextrine modifiée est une bêta-

cyclodextrine estérifiée par des groupes alcanoyle de 2 à 20 atomes de carbone.

5 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la cyclodextrine modifiée est une bétacyclodextrine estérifiée par des groupes alcanoyle de 6 à 14 atomes de carbone.

10 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la molécule active est un principe actif médicamenteux ou un précurseur médicamenteux à usage humain ou vétérinaire, un réactif biologique ou un principe cosmétique, un virus, un constituant de virus, de bactérie ou de cellule, un antigène, un allergène ou une enzyme.

15 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le rapport des volumes phase (1)/phase (2) est de 0,1 à 1.

19 9. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la totalité de l'eau est éliminée par lyophilisation.

20 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le(s) surfactif(s) est (sont) présent(s) en une proportion de 0,1 à 10%, de préférence 0,2 à 2% en poids de la suspension colloïdale obtenue dans l'étape 3.

25 11. Utilisation des nanosphères de cyclodextrine modifiée obtenues suivant l'une quelconque des revendications 1 à 10 comme vecteurs de principes actifs médicamenteux ou cosmétiques.

30 12. Utilisation des nanosphères de cyclodextrine modifiée obtenues suivant l'une quelconque des revendications 1 à 10 comme vecteur de produits chimiques.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00594

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. 5 A61K9/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. 5 A61K ; B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | FR,A,2 551 072 (SANDOZ) 1 March 1985 see page 4, line 32 - page 4, line 34 see page 5, line 1-34 see page 6, line 1-6 see page 9, line 24 - page 9, line 34 see page 10, line 21 - page 10, line 31 see page 11, line 18 - page 11, line 23 -.- | 1,2,4-7, 11,12 |
| A | WO,A,8 400 294 (SCHRÖDER) 2 February 1984 see page 3, line 30 - page 3, line 37 see page 4, line 1-38 see page 5, line 1-22 see page 6, line 1-28 see page 8, line 19 - page 8, line 21 -.- | 1,3,7, 11,12 |
| | | -/- |

| | | | |
|---|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> | Further documents are listed in the continuation of Box C. | <input type="checkbox"/> | See patent family annex. |
| "A" | Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" | later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "E" | "E" earlier document but published on or after the international filing date | "X" | document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" | "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" | document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" | "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" | document member of the same patent family |
| "P" | "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search | 31 August 1993 (31.08.93) | Date of mailing of the international search report | 16 September 1993 (16.09.93) |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Facsimile No. | Authorized officer | Telephone No. | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 93/00594

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | EP,A,0 274 961 (CNRS) 20 July 1988 see column 2, line 37 - column 2, line 53. see column 3, line 1-55 see column 4, line 1-44 see column 5, line 10 - column 5, line 14 -.- -.-.-.-. | 1-3,9 |

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300594
SA 75469

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 31/08/93

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|----------|------------------|
| FR-A-2551072 | 01-03-85 | CH-A- | 656884 | 31-07-86 |
| | | AT-B- | 395584 | 25-01-93 |
| | | AU-B- | 575066 | 21-07-88 |
| | | AU-A- | 3234884 | 28-02-85 |
| | | BE-A- | 900406 | 22-02-85 |
| | | DE-A- | 3430852 | 14-03-85 |
| | | GB-A, B | 2145422 | 27-03-85 |
| | | JP-A- | 60076531 | 01-05-85 |
| | | LU-A- | 85514 | 24-04-85 |
| | | NL-A- | 8402547 | 18-03-85 |
| | | SE-B- | 462098 | 07-05-90 |
| | | SE-A- | 8404225 | 27-02-85 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-8400294 | 02-02-84 | AU-B- | 567434 | 19-11-87 |
| | | AU-A- | 1776083 | 08-02-84 |
| | | DE-A- | 3376797 | 07-07-88 |
| | | EP-A, B | 0113749 | 25-07-84 |
| | | US-A- | 4713249 | 15-12-87 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| EP-A-0274961 | 20-07-88 | FR-A- | 2608942 | 01-07-88 |
| | | DE-A- | 3777793 | 30-04-92 |
| | | JP-A- | 63232840 | 28-09-88 |
| | | US-A- | 5049322 | 17-09-91 |
| | | US-A- | 5174930 | 29-12-92 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00594

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ?

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB
CIB 5 A61K9/51

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée^a

| Système de classification | Symboles de classification |
|--|----------------------------|
| CIB 5 | A61K ; B01J |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté | |

III. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS¹⁰

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³ | No. des revendications visées ¹⁴ |
|-------------|--|---|
| X | FR,A,2 551 072 (SANDOZ) 1 Mars 1985 voir page 4, ligne 32 - page 4, ligne 34 voir page 5, ligne 1-34 voir page 6, ligne 1-6 voir page 9, ligne 24 - page 9, ligne 34 voir page 10, ligne 21 - page 10, ligne 31 voir page 11, ligne 18 - page 11, ligne 23 --- | 1,2,4-7, 11,12 |
| A | WO,A,8 400 294 (SCHRÖDER) 2 Février 1984 voir page 3, ligne 30 - page 3, ligne 37 voir page 4, ligne 1-38 voir page 5, ligne 1-22 voir page 6, ligne 1-28 voir page 8, ligne 19 - page 8, ligne 21 --- | 1,3,7, 11,12 |
| | | -/- |

^a Catégories spéciales de documents cités¹¹:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document qui fait l'objet d'une réquisition de demande ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (vise qu'en indique)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un stage, à une exposition ou tout autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document utilisé publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'apparaissant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme évidente ou comme impliquant une activité inventive

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive, mais l'invention revendiquée est évidente ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

"A" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 AOUT 1993 31 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16.09.93

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

MEERTENS J.

| III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴ | | (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUE SUR LA DEUXIEME FEUILLE) |
|--|---|--|
| Catégorie ¹⁵ | Identification des documents cités ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷ | No. des revendications visées ¹⁸ |
| A | EP,A,0 274 961 (CNRS) 20 Juillet 1988 voir colonne 2, ligne 37 - colonne 2, ligne 53 voir colonne 3, ligne 1-55 voir colonne 4, ligne 1-44 voir colonne 5, ligne 10 - colonne 5, ligne 14 ----- | 1-3, 9 |

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300594
SA 75469

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Cesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

31/08/93

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | | Date de publication |
|---|--------------------------------|---|----------|--------------------------------|
| FR-A-2551072 | 01-03-85 | CH-A- | 656884 | 31-07-86 |
| | | AT-B- | 395584 | 25-01-93 |
| | | AU-B- | 575066 | 21-07-88 |
| | | AU-A- | 3234884 | 28-02-85 |
| | | BE-A- | 900406 | 22-02-85 |
| | | DE-A- | 3430852 | 14-03-85 |
| | | GB-A, B | 2145422 | 27-03-85 |
| | | JP-A- | 60076531 | 01-05-85 |
| | | LU-A- | 85514 | 24-04-85 |
| | | NL-A- | 8402547 | 18-03-85 |
| | | SE-B- | 462098 | 07-05-90 |
| | | SE-A- | 8404225 | 27-02-85 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-8400294 | 02-02-84 | AU-B- | 567434 | 19-11-87 |
| | | AU-A- | 1776083 | 08-02-84 |
| | | DE-A- | 3376797 | 07-07-88 |
| | | EP-A, B | 0113749 | 25-07-84 |
| | | US-A- | 4713249 | 15-12-87 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| EP-A-0274961 | 20-07-88 | FR-A- | 2608942 | 01-07-88 |
| | | DE-A- | 3777793 | 30-04-92 |
| | | JP-A- | 63232840 | 28-09-88 |
| | | US-A- | 5049322 | 17-09-91 |
| | | US-A- | 5174930 | 29-12-92 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |